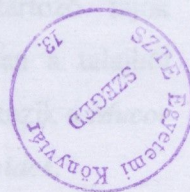


**A GLICERINALDEHID-3-FOSZFÁT DEHIDROGENÁZT
(GPD) KÓDOLÓ GÉN KLÓNOZÁSA *MUCOR*
CIRCINELLOIDES-BŐL TRANSZFORMÁCIÓS RENDSZER
KIDOLGOZÁSA CÉLJÁBÓL**



A doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Készítette:

Ács Klára

Témavezető:

Dr. Vágvölgyi Csaba

SZTE TTK

Mikrobiológiai Tanszék

2005

BEVEZETÉS

A járomspórás gombák (Zygomycetes) rendszertanilag jól körülhatárolható csoportot alkotnak. Az ide tartozó fajok többsége a *Mucorales* rend tagja, ezek elsősorban a talajból izolálható szaprofita szervezetek. Ebbe a rendbe tartozik a *Mucor* nemzetség is, melynek egyik faja a *Mucor circinelloides*.

E gombafajban ez idáig alkalmazott transzformációs rendszer egy auxotrófia mutáció komplementációjára épül. A módszer nagy hátránya, hogy a transzformációt megelőzően minden törzsből stabil (*leu*⁻) mutánsokat kell izolálni. Ezért ésszerűnek tűnik egy homológ promóteren alapuló transzformációs rendszer kidolgozása, amely egy megfelelő rezisztencia gén (mint szelekciós marker) erős kifejeződésére épülne. Erős promóter aktivitásának köszönhetően a *gpd* gén 5' régióját számos esetben felhasználták gomba transzformációs rendszerek kialakítására, ezért határoztunk úgy, hogy az általunk kifejlesztendő transzformációs rendszerhez a *M. circinelloides* *gpd* gén határoló régióit használjuk fel.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink lehetőséget teremtenek a *M. circinelloides gpd* gén molekuláris, funkcionális és filogenetikai elemzésére, egyben kiindulópontul szolgálnak további genetikai kísérletekhez. Ennek megfelelően:

1. A kísérleteink részeként célul tűztük ki a *M. circinelloides f. lusitanicus* ATCC 1216b törzsből génkönyvtár létrehozását.
2. A glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) struktúrgén és a kapcsolódó szabályzó régiók klónozását és szekvenciaszintű elemzését.
3. Célul tűztük ki néhány járomspórás gomba transzformáláshoz szükséges kísérleti feltételeinek meghatározását.
4. Célul tűztük ki a *M. circinelloides f. lusitanicus gpd1* és *gpd2* génjeinek 5' és 3' határoló régióinak felhasználásával új

transzformáló vektorok létrehozását, továbbá ezekkel történő transzformáció megvalósítását.

Eredményeink reményeink szerint lehetővé teszik egy új a járomspórás gombáknál alkalmazható transzformációs rendszer kidolgozását.

MÓDSZEREK

- mikrobiológiai tenyésztési eljárások,
- polimeráz láncreakció (PCR),
- DNS manipulációk (gél elektroforézis, hibridizáció, emésztés, ligálás, nem radioaktív jelölés, vektor építés)
- genomiális génkönyvtár készítés és maipuláció
- baktérium és gomba transzformáció

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

***M. circinelloides* glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) génjének klónozása és jellemzése**

Jelen munkánk során genomi génkönyvtárat hoztunk létre *Mucor circinelloides* ATCC 1216B törzsből λ Fix II fágban, melynek átlagos inszert mérete 10 kb és a genomot 12-szer fedi

le. *M. circinelloides* glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (*gpd*) génjének izolálása érdekében a génkönyvtárat *gpd* specifikus homológ próbával szűrtük.

A komplett szekvencia 1861 nukleotidot tartalmaz, ebből 356 nukleotid promóter és 298 nukleotid terminális régió. A *gpd2* struktúr gént 1213 nukleotid építi fel, mely 4 exont és 3 intront foglal magába.

Az 5' határoló promóterben azonosítottuk (a start kodontól -74 nukleotidnyira) a konszenzus TATA-box-ot, és (-135 nukleotidnyira) a CAAT-box-ot, illetve (-257 pozícióban) a STRE motívumot. Ez utóbbit komplementer inverz formában (5' CCCCT 3'), és amely feltehetően a gén stressz körülmények közötti aktivációjában érintett.

A 3' határoló terminális szekvencia a stop kodontól 58 nukleotidnyira tartalmazza azt a konszenzus szekvenciát (ATAAAA), amely valószínűleg a poliadenilációért felelős. A GPD fehérjét 339 aminosav alkotja, mely más gombákból származó GPD szekvenciákkal - a nagyban különböző taxonómiai hovatartozás ellenére - nagy hasonlóságot mutat.

Néhány járomspórás gomba transzformáláshoz szükséges kísérleti feltételeinek meghatározása

Optimális feltételeket dolgoztunk ki a gombák higromicin érzékenységének növelésére. Mivel a kísérleteinkhez választott mindkét törzs igen erős növekedést mutatott még 400 µg/ml antibiotikum koncentrációnál is, szükségessé vált érzékenyítő anyagok antibiotikummal való együttes alkalmazása. Amely egyben a gyors növekedésű járomspórás gombafajok esetében lehetővé tette különálló telepek megfigyelését.

A kísérletek eredményeképpen sikerült a megfelelő transzformációs közeget kidolgoznunk és optimalizálnunk, mely a kívánt érzékenyítést és a növekedésgátlást *M. circinelloides* esetében már 100 µg/ml higromicin jelenlétében lehetővé tette.

M. circinelloides f. *lusitanicus* *gpd1* és *gpd2* génjeinek 5' és 3' határoló régióinak felhasználásával új transzformáló vektorok létrehozása

Transzformációs vektorokat készítettünk, melyek egyike (pAK1) tartalmazza a bakteriális eredetű higromicin B rezisztencia (*hph*) gént melynek kifejeztetéséhez *M.*

circinelloides glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz *gpd1* gén promóterét és terminális régióját alkalmaztuk. A másik transzformáló plazmidban (pAK3) *M. circinelloides* glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz *gpd2* szabályozó régióit használtuk fel a *hph* gén expressziójához, továbbá ez a vektor auxotróf szelekciót is lehetővé téve tartalmazza a *M. circinelloides* α -izo-propilmalát izomeráz (*leuA*) génjét.

Új transzformáló vektorokkal történő transzformáció megvalósítása

Sikeres transzformációs kísérleteket végeztünk pAK1 vektorral. Az M20 törzsből származó 2.5×10^6 /ml protoplasztot transzformálva (10 μ g/ml plazmid DNS), viszonylag alacsony 2 transzformáns/ μ g DNS gyakoriságot eredményezett. A transzformánsok a szelekciós táptalajon 2-3 nap elteltével mutattak mikroszkóppal megfigyelhető micéliális növekedést. Azonban nem bírtak stabil fenotípussal, hiszen spóráikból a szelekciós körülmények folyamatos megléte ellenére sem képződött a további átoltasok során telep. A pAK3 vektorral végzett transzformálási kísérleteink során alkalmazott törzs a *leu⁻* MS12 volt, melyből 10^6 /ml

6

protoplaszt inkubálása 10 μ g plazmiddal, 10 transzformáns/ μ g DNS transzformáns gyakoriságot eredményezett. A transzformált protoplasztokat elsőként minimál táptalajon neveltük leu⁻ auxotrófiára szelektálva. A pAK3 vektor transzformáns telepekben való jelenlétét spóra PCR reakcióval is igazoltuk. Ezt követően a plazmid másik szelekciós markerét felhasználva a transzformáns telepek spóráit higromicin B rezisztenciára vizsgáltuk. A bakteriális eredetű *hph* gén kifejeztetésére *M. circinelloides gpd2* gén határoló régióit alkalmaztuk. Tapasztalatunk, miszerint a spórák a szelekciós táptalajon nem voltak képesek növekedésre, alátámasztja Wolff és Arnau (2002) azon eredményeit, hogy a *gpd2* gén az adott körülmények között nem fejeződik ki.

A járomspórás gombák molekuláris analízise nehéz feladat a megbízható és általánosan alkalmazható genetikai transzformációs rendszer hiánya miatt. E rendszer hiányosságai egyrészt a gomba csoportra jellemző cönocitikus micéliumnak, másrészt másik jellemző tulajdonságuknak, az idegen DNS extrakromoszómális elemként való fenntartásának köszönhető.

A feladatot tovább nehezíti ezen gombacsoport a legtöbb antibiotikummal szemben mutatott nagymértékű rezisztenciája.

KÖZLEMÉNYEK

1. Vágvölgyi, Cs., Vastag, M., Ács, K., and Papp, T. (1999). *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. Mycol. Res. 103, 1318-1322.
2. Vágvölgyi, Cs., Kasza, Zs., Nyilasi, I., Ács, K., and Papp, T. (2001). Variability of isozyme and RAPD markers among isolates of *Mucor genevensis*. Acta Biol. Hung. 52, 365-373.
3. Ács, K., Kasza, Zs., Lukács, Gy., Schwab, H. and Vágvölgyi, Cs. (2002) Cloning and sequence analysis of *Mucor circinelloides* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49, 305-312.
4. Papp, T., Ács, K., Nyilasi, I., Nagy, E. and Vágvölgyi, Cs. (2003) Phylogenetic relationships of the genus *Gilbertella* and related genera within the order Mucorales based on 5.8 S ribosomal DNA sequences. Acta Biol Hung. 54, 393-402.
5. Ács, K., Nyilasi, I., Papp, T., and Vágvölgyi, Cs. (2003) Development of new vector systems for transformation of zygomycetes. FEMS Microbiol. Letters 222, S. 1. 452.
6. Vágvölgyi, Cs., Heinrich, H., Ács, K., and Papp, T., (2004) Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. Antonie van Leeuwenhoek 86, 181-188.

7. Vastag, M., Kasza, Zs., **Ács, K.**, Papp, T., Schwab, H., and Vágvölgyi, Cs., (2004) Cloning and sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the zygomycetes fungus *Rhizomucor miehei*. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 111-119.
8. Nyilasi, I., **Ács, K.**, Papp, T., and Vágvölgyi, Cs. (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol.* (submitted).

POSZTER PREZENTÁCIÓK

1. Vastag, M., Nagy, Á., Papp, T., **Ács, K.**, and Vágvölgyi, Cs. (1998) Investigation of the taxonomic position of *Rhizomucor tauricus*. *Acta Microbiol. Hung.* 46, 134-135.
2. Vastag, M., Papp, T., **Ács, K.**, and Vágvölgyi, Cs. (1999) Intraspecific variability of thermophilic *Rhizomucor* species as assessed by randomly amplified polymorphic DNA. *Acta Microbiol. Hung.* 46, 351.
3. Vastag, M., Garas, K., Papp, T., **Ács, K.**, and Vágvölgyi, Cs. (1999) The antifungal activity of lovastatin against *Rhizomucor* strains. *Acta Microbiol. Hung.* 47, 383-384.
4. Papp, T., Nyilasi, I., **Ács, K.**, Vastag, M. and Vágvölgyi, Cs. (2000) A *Gilbertella persicaria* taxonómiai helyének vizsgálata a glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz gén és magi riboszómális –DNS szekvenciák alapján. MMT 2000. évi Nagygyűlése, Keszthely, Összefoglalók.

5. **Ács, K., Kasza, Zs., Vastag, M. and Vágvolgyi, Cs. (2000)** Cloning and sequence analysis of *Mucor circinelloides* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. MMT 2000., Keszthely, Hungary, Abstracts

6. **Vágvolgyi, Cs., Ács, K., Palágyi, Zs., and Papp, T. (2000)** A *Gilbertella persicaria* filogenetikai pozíciójának vizsgálata klónozott gliceraldehyde-3-foszfát dehidrogenáz szekvenciák alapján. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 5. Munkaértekezlete, Sopron, 2000, Abstracts, 150

7. **Ács, K., Vastag, M., Kasza, Zs. and Vágvolgyi, Cs. (2001)** Cloning of *Rhizomucor miehei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. MMT 2001, Balatonfüred, Hungary, Abstracts.

8. **Vágvolgyi, Cs., Vastag, M., Kasza, Zs., and Ács, K. (2002)** Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Rhizomucor miehei*. IMC-7, Oslo, Abstracts 362.

9. **Nyilasi, I., Ács, K., Lukács, Gy., Papp, T., Kasza, Zs., and Vágvolgyi, Cs. (2003)** *Mucor circinelloides* *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített transzformációja. V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, Összefoglalók 144-145.

10. **Ács, K., Nyilasi, I., Lukács, Gy., Kasza, Zs., Papp, T., and Vágvolgyi, Cs. (2003)** New transformation approaches for zygomycetes. 14th Int. C. Hung. Soc. Microbiol. Balatonfüred, Abstracts.

11. Lukács, Gy., **Ács, K.**, Vastag, M., Papp, T., and Vágvölgyi, Cs. (2003) Molecular analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Rhizomucor miehei*. 14th Int. C. Hung. Soc. Microbiol. Balatonfüred, Abstracts.
12. Nyilasi, I., Papp, T., **Ács, K.**, and Vágvölgyi, Cs. (2003) Comparison of ITS and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase sequences among the genus *Gilbertella* and some related genera of the Mucorales. 14th Int. C. Hung. Soc. Microbiol. Balatonfüred, Abstracts.
13. Lukács, Gy., **Ács, K.**, Vastag, M., Nyilasi, I., Kasza, Zs., and Vágvölgyi, Cs. (2004) Cloning and partial sequence analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Rhizomucor miehei*. Acta Microbiol. Hung. 51, 125.